

Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin
im Klinikum Steglitz, Hindenburgdamm 30

Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

ÜBER DIE PROTEOLYTISCHE AKTIVITÄT POLYMORPHKERNIGER LEUKOCYTEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Theodor Balsing

aus Harsewinkel / Westfalen

1971

Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin
im Klinikum Steglitz, Hindenburgdamm 30

Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

ÜBER DIE PROTEOLYTISCHE AKTIVITÄT POLYMORPHKERNIGER LEUKOCYTEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Theodor Balsing

aus Harsewinkel / Westfalen

Referent: Professor Dr. med. U. M. Gross

Korreferent: Professor Dr. med. V. Becker



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 14. 9. 1971

Inhaltsverzeichnis

I.)	Einführung	Seite	1 - 4
II.)	Material und Methodik	Seite	5 - 11
III.)	Ergebnisse	Seite	12 - 20
IV.)	Diskussion	Seite	21 - 25
V.)	Zusammenfassung	Seite	26 - 27
VI.)	Literaturverzeichnis	Seite	28 - 38
VII.)	Lebenslauf	Seite	40

In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

C	Grad Celsius
DNS	Desoxyribonucleinsäure
E	Extinktion
g	Gramm
g%	Gramm des gelösten Stoffes in 100ml Lösung
h	Stunden
mm	Millimü
ml	Milliliter
min	Minute
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
m-RNS	messenger - RNS
nm	Nanometer
p.L.	polymorphkerniger Leukocyt
P	Warscheinlichkeit P der Normalverteilung
RNS	Ribonucleinsäure
sec	Sekunde
Std.	Stunde
t-RNS	transfer - RNS
t	Zeit
TCE	Trichloressigsäure

I.) Einführung

Seit Neumann 1868 (1) das Knochenmark als Entstehungsort der cellulären Blutelemente erkannte, hat sich die Forschung bemüht, die Funktion der Leukocyten zu klären. Nur wenige Jahre später unterschied Ehrlich (2) mit Hilfe seiner Triazidfärbung (Methylgrün, Orange G und Säurefuchsin) die neutrophilen Granulocyten und die Myelocyten als zusammengehörige Zellgruppe von den lymphatischen Zellelementen, womit die dualistische Auffassung von der Entstehung der Blutzellen begründet wurde (Dualismus). Metschnikoff (3), Wolff (4) und andere beschrieben um die Jahrhundertwende die amöboide Bewegung und die Phagocytose als Eigenschaften von granulierten Leukocyten. Dadurch sind die Granulocyten in der Lage, sich aktiv im Gewebe zu bewegen und phagocytierbares Material intracellulär zu verdauen.

Zur Morphologie der polymorphkernigen Leukocyten

Lichtmikroskopisch zeigen die polymorphkernigen Leukocyten (p.L.) als gemeinsames Merkmal eine Granulierung des Cytoplasmas. Nach dem färberischen Verhalten dieser Granula unterscheidet man neutrophile, eosinophile und basophile Granulocyten. Alle reifen Granulocyten besitzen einen unregelmäßig gestalteten Zellkern. Der Grad der Segmentierung gilt als Ausdruck des Reifezustandes der Granulocyten (5). Jüngeren Formen ist eine geringere Kernlappung eigen als älteren.

Elektronenmikroskopisch und biochemisch konnte die enzymatische Aktivität bestimmten Zellstrukturen zugeordnet werden. Das endoplasmatische Reticulum und die Ribosomen sind wie auch in anderen Zellen Ort der Proteinsynthese (6). Die Mitochondrien sind Träger der Enzyme des Carbonsäurezyklus und der oxydativen Phosphorylierung. Der Golgi-Apparat ist Entstehungsort der Granula in den Leukocyten (7,8). In den p.L. unterscheidet man zwei Arten von Granula: azurphile von etwa 800 μ und spezifische Granula von etwa 500 μ (7-9).

Die enzymatische Aktivität dieser primären Lysosomen ist in den einzelnen Entwicklungsstufen (10) und in den beiden Granulaarten unterschiedlich (7.12).

Zur Biochemie

Die Bestimmung von biochemischen Bestandteilen (13-18) und Enzymaktivitäten der p.L. ergab Aussagen über Stoffwechseländerungen (19-24) und biochemische Grundlagenkenntnisse der Phagocytose (25, 26). Es ist heute bekannt, daß die p.L. eine reichhaltige enzymatische Ausstattung besitzen: Phosphatasen, Esterasen, Oxidasen, Peroxidase, Amylase, Lipase, Lysozyme, Ribonuclease etc. (8, 9, 27-30). Diese Untersuchungen sind zum Teil mit Gesamtleukocyten aus Menschenblut, teils auch mit tierischen p.L. durchgeführt worden.

Ein wesentliches Merkmal der neutrophilen p.L. ist ihre große Beweglichkeit und ihre enzymatische Proteolyse. In den Promyelocyten, Myelocyten, Metemyelocyten und p.L. sind Endo- und Exopeptidasen nachgewiesen worden (31-39). Hierbei handelt es sich um Amino- und Carboxypeptidasen. Spätere Studien erbrachten eine genauere Charakterisierung der Enzyme. So weisen Lapresle und Webb wie auch Stefanovic und Mitarbeiter (40-42) proteolytische Aktivität mit einem pH-Optimum bei pH=3 nach. Sie zeigten, daß es sich um die Cathepsine A, B, C, D und E handelt. Im gleichen pH-Optimum finden auch Mounter und Atiyeh starke proteolytische Aktivität (43). Panlitschko und Statmann (44) weisen nach, daß zum Unterschied von kristallisiertem Trypsin die alkalische Leukocytenprotease - pH=7,4 - das Ovalbumin angreift. Nach ihren Untersuchungen existiert die alkalische Protease nur in den Zellen der myeloidischen Reihe; ferner wird sie durch Serum weniger gehemmt als kristallisiertes Trypsin (44). Die alkalische Protease wird nach Mounter und Atiyeh (43) durch Di-n-butyl-1-äthoxy-22'-dichlorvinyl-Phosphat geringer inhibiert als Trypsin und Chymotrypsin. In der pH-Abhängigkeit zeigt sich aber eine

große Ähnlichkeit mit Trypsin und Chymotrypsin. Nach Fleischer (45) besitzt die Glycylglycin-Dipeptidase - pH=7,7 - in den Lymphocyten größere Aktivität als in den p.L.; dieses Enzym wird durch Kobalt-Jonen aktiviert. Dagegen zeigt die Tripeptidase - Spaltung von Glycylglycylglycin - in den p.L. größere Aktivität als in den Lymphocyten und eine größere Stabilität als die Dipeptidase. Sie wird ebenfalls von Kobalt-Jonen aktiviert. Ältere Menschen zeigen nach Stern und Mitarbeiter (46) eine deutlich höhere Hydrolyserate der Tripeptidase-Aktivität als jüngere.

Alle bisherigen Untersuchungen weisen darauf hin, daß es sich bei der proteolytischen Aktivität im alkalischen Bereich - pH=7 bis pH=8 - nicht um die Wirkung eines Enzymes handeln kann, sondern daß sich die Aktivität aus dem Zusammenwirken mehrerer Enzyme ergibt. In welchem Maße sich die proteolytischen Enzyme untereinander beeinflussen, kann aus den bisherigen Untersuchungen nicht gesagt werden.

Steroide und Antibiotika werden heute in beträchtlichem Umfang im klinischen Bereich angewendet. Da diese Pharmaka in den Proteinhaushalt der Zelle eingreifen, ist zu fragen, ob durch diese Pharmaka die proteolytische Aktivität der p.L. beeinflusst werden kann, denn die p.L. sind die wesentlich bestimmenden cellulären Elemente bei der akuten Entzündung mit vasculär haematogener Reaktion.

Zu diesem Zweck haben wir die proteolytische Aktivität isolierter p.L. der Ratte nach Behandlung mit verschiedenen Steroiden (Cortisol, Triamcinolon, Dexamethason) Antibiotika (Actinomycin D, Cycloheximid, Streptomycin) und dem Tetracyclin Reverin untersucht. Für die Verwendungsmöglichkeiten dieser Pharmaka ist auch ihr Einfluß auf die Änderung der Leukocytenzahl im peripheren Blut und in der Peritonealhöhle von Bedeutung. Zu diesem Zweck ist die Gesamtzellzahl im Peritonealexsudat und mit Hilfe von Ausstrichpräparaten das relative Verhältnis der Zellen zueinander bestimmt worden.

In welchem Umfange der Proteingehalt und somit die spezifische Aktivität durch diese Pharmaka verändert werden, ist ebenfalls untersucht worden.

II.) Material und Methodik

Die polymorphkernigen Leukocyten werden in einer modifizierten Methode nach Karnovsky und Mitarb. gewonnen (21,24). Männlichen Sprague-Dawley Ratten (200-300g Körpergewicht) werden 20 ml einer 12%igen Lösung von Natrium-Caseinat in physiologischer NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert (Na-Caseinat nach Hammarsten, Fa. Merck A.G. Darmstadt). Nach 24 Stunden werden die Tiere dekapitiert, die Bauchhöhle wird eröffnet und das Exsudat in eiskalte calciumfreie Ringerlösung mit einem Zusatz von 0,25% Natriumcitrat aufgenommen. Auf den Zusatz von Calcium-Jonen wird verzichtet, da durch Bildung von schwerlöslichem Calciumsalz des Caseins eine leichte Opaleszenz auftritt, wodurch die Spaltung des Caseins gegenüber Ansätzen ohne Ca-Jonen um etwa 10% verringert wird (48).

Die Leukocytenzahl wird in der Zählkammer nach Neubauer bestimmt und ein Ausstrichpräparat zur Differentialzellzählung angefertigt (Färbung nach Giemsa). Nach 10 min. werden die Zellen bei $1700 \times g$ 2min. abzentrifugiert (Stock Kühlzentrifuge). Die Zellen werden nach vorsichtigem Dekantieren erneut in calciumfreie Ringerlösung ohne Na-citrat aufgenommen. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Einer erneuten Zählung entsprechend werden die Zellen in einer Konzentration von 50×10^6 Zellen pro ml aufgenommen.

Anschließend werden die Zellen homogenisiert (Branson Sonic Power "Sonifier", 20 sec. bei Stufe 4). Das Homogenat wird dann 1 min. bei $10000 \times g$ zentrifugiert (Sorvall Superspeed "RC 2-B") und der Überstand zur Aktivitätsbestimmung verwendet. Zeiten und Temperatur (Eiswasserbad und Kühlzentrifuge) werden genau eingehalten, um eine vorzeitige enzymatische Aktivität zu unterbinden.

Im Vorversuch wird die Methode von Kunitz (49) anhand der Spaltung von Casein durch kristallisiertes ~~Tryp~~trypsin (2000

Einheiten pro g, Fa. Merck A.G., Darmstadt) überprüft. Es zeigt sich eine lineare Abhängigkeit des Umsatzes von der eingesetzten Trypsinmenge zwischen $\Delta E = 0,075$ und $\Delta E = 0,350$ (s. Abb. 1). Dementsprechend wird die Zellpräparation verdünnt.

Die proteolytische Aktivität der p.L. wird durch die Spaltung von 1%iger Na-Caseinat Lösung bei $35,0^{\circ}\text{C}$ und $\text{pH}=7,6$ bestimmt. Es wird die Zunahme trichloressigsäurelöslicher Aminosäuren bei 280 nm gegen Wasser gemessen (49). Die Messung wird mit Quarzküvetten (Schichtdecke 1 cm) im Zeiss Spectralphotometer "PM Q II" durchgeführt.

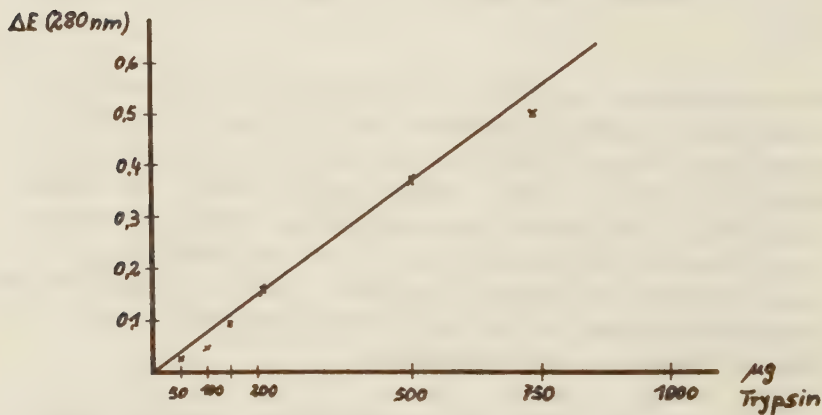


Abb. 1 : Abhängigkeit der Hydrolyse von 1,0g% Na-Caseinat von der eingesetzten Menge Enzym (Trypsin) bei 35°C und 15 min Inkubationszeit

Lösungen: I.) Phosphatpuffer nach Sørensen: 0,1 Mol; $\text{pH}=7,6$

II.) Substratlösung: 1,0g Na-Caseinat nach Hammarsten ad 100 ml Phosphatpuffer

Bestimmungsansatz:

Meßwert: 1 ml Homogenat
1 ml Substratlösung
nach genau 15 min.: 3ml Trichloressigsäure 5%ig

Leerwert: 1 ml Homogenat
3 ml Trichloressigsäure 5%ig
nach genau 15 min. : 1 ml Substratlösung

Der Proteingehalt der homogenisierten Zellen wird nach Lowry und Mitarb. bestimmt (50). Es wird die Extinktion der freigesetzten Folin-positiven Aminosäuren gemessen. Die Eichung wird mit einer definierten Proteinlösung (Lab-Trol der DADE Reagents Inc. Miami, Florida, U.S.A.) vorgenommen.

Der Einfluß von Antibiotika, Steroiden und dem Tetracyclin Reverin auf die proteolytische Aktivität polymorphkerniger Leukocyten wird untersucht.

Allen Tieren wird 24 Stunden oder 48 Stunden und 24 Stunden vor der Dekapitation das Pharmakon i.p. appliziert. Zur Gewinnung der p.L. wird sämtlichen Tieren 24 Stunden vor der Tötung 20 ml 12%iges Na-Caseinat i.p. injiziert.

Actinomycin D: (Fa. Serva, Heidelberg)

- 1.) Die 10 Tiere der ersten Reihe erhalten 24 Std. vor der Tötung 200 µg Actinomycin D pro kg Körpergewicht i.p. .
- 2.) In der zweiten Reihe erhalten 10 Tiere jeweils 48 Std. und 24 Std. vor der Dekapitation 200 µg Actinomycin D pro kg Körpergewicht i.p. .

Cycloheximid: (Actidion der Fa. Serva, Heidelberg)

Den 10 Tieren wird 1,25 mg Cycloheximid pro kg Körpergewicht i.p. injiziert. Alle Tiere zeigen nach 24 Std. eine Gewichtsabnahme von 3 - 5 g; sie sind in ihrem Allgemeinzustand reduziert.

Reverin: (Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt)

Den 10 Tieren wird 4,0g Reverin pro kg Körpergewicht

i. p. injiziert. Die Injektionen erfolgen 48 Std. und 24 Std. vor der Dekapitation.

Streptomycin: (Streptomycinsulfat der Fa. Bastian, München)
Die Tiere bekommen 48 Std. und 24 Std. vor der Tötung 14,285 mg Streptomycin pro kg Körpergewicht i.p. injiziert.

Cortisol: (Scheroson F der Fa. Schering AG, Berlin)
Die i.p. Injektionen erhalten die 10 Tiere 48 Std. und 24 Std. vor der Dekapitation. Die Dosis beträgt 100 mg Cortisol pro kg Körpergewicht. Zwei Tiere sterben vor Ablauf der 48 Stunden.

Triamcinolon: (Acetonid der Fa. Meyden, Regensburg)
Pro kg Körpergewicht wird den 10 Tieren 48 Std. und 24 Std. vor der Tötung 2,0 mg Triamcinolon i.p. appliziert.

Dexamethason: (Dexa-Scheroson der Fa. Schering AG, Berlin)
Den 10 Tieren wird 48 Std. und 24 Std. vor der Tötung 0,25 mg Dexamethason i.p. injiziert. Bei allen Tieren findet sich eine Gewichtsabnahme von 5 - 10 g. Ihr Allgemeinzustand ist reduziert; zwei Tiere sterben nach 45 Stunden.

Alle Injektionen erfolgen morgens zwischen 9 Uhr und 10 Uhr. Der gewohnte Tages- und Nachtrhythmus wird nicht unterbrochen. Als Nahrung erhalten die Tiere Preßfutter und Wasser.

Die Abhängigkeit der Spaltung des Na-Caseinats vom pH-Wert - verwendet werden der Phosphatpuffer nach Sörensen und der Britton-Robinson II Puffer - ergibt die gleiche Abhängigkeit mit den Maxima bei pH=6 und pH=8. Diese Ergebnisse legen nahe, daß zumindest zwei proteolytische Enzyme in diesem Wirkungsbereich ihr Optimum haben (s. Abb. 2).

Die Abhängigkeit der Spaltung des Caseins unter pH=4 wird nicht untersucht. Hier fanden Mounter und Atiyeh (43) proteolytische Aktivität mit einem Maximum bei pH=3. Lapresle

und Webb (40,41) und Stefanovic und Mitarb. (42) zeigten, daß es sich um die Cathepsine A, B, C, D und E handelt.

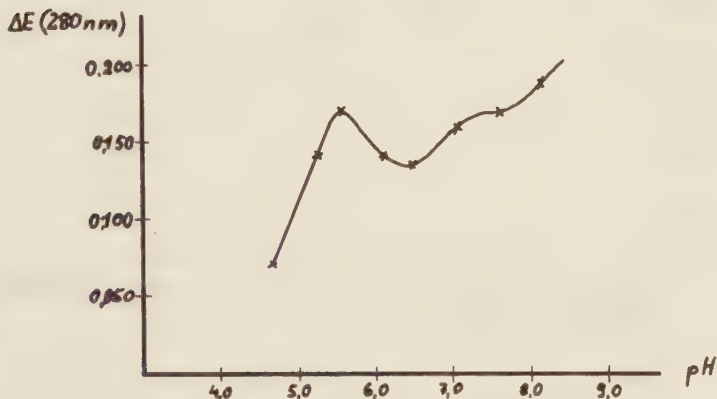


Abb. 2: Abhängigkeit der alkalischen Protease vom pH-Wert; 1,0 g% Na-Caseinat, Temperatur 35° C, Inkubationszeit 15 min.

Die Untersuchung der Substratabhängigkeit bei pH=7,6 ergibt, daß es bei einer größeren Substratkonzentration als 1,5 g Na-Caseinat ad 100 ml Pufferlösung zu einer Hemmung der proteolytischen Aktivität kommt (s. Abb. 3). Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit Substratkonzentrationen von 1,0 g% und 1,5 g% ergibt nur eine sehr geringe Differenz. Deshalb werden alle Bestimmungen mit einer Substratkonzentration von 1,0 g% Na-Caseinat ausgeführt. Höhere Substratkonzentrationen sind nur schwer in Lösung zu bringen.

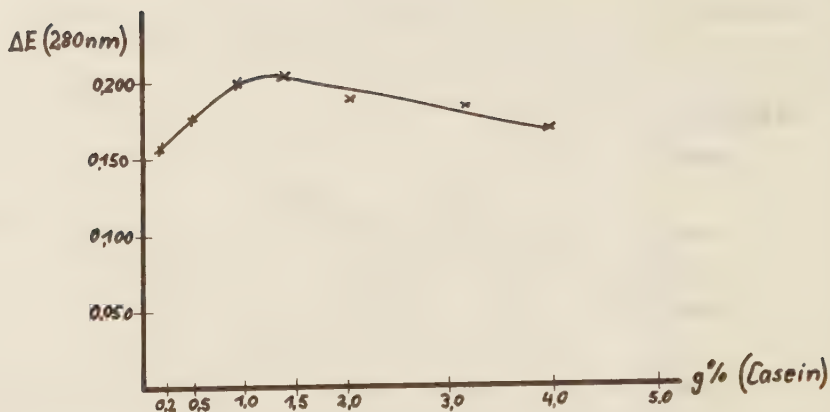


Abb. 3: Beziehung der proteolytischen Aktivität zur eingesetzten Menge Substrat (Na-Caseinat); pH=7,6, Temperatur $35^{\circ}C$, Inkubationszeit 15 min.

Die Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von der Inkubationszeit zeigt einen Abfall der Aktivität bei Zeiten unter 5 min und von mehr als 20 min (s. Abb. 4). Um bei der Bestimmung der Aktivität innerhalb der linearen Abhängigkeit zu bleiben, werden alle Untersuchungen mit einer Inkubationszeit von 15 min durchgeführt.

Bei der Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit unterschiedlichen Konzentrationen an p.L. pro ml Ansatz zeigt sich die gleiche Abhängigkeit wie bei der Bestimmung mit kristallisiertem Trypsin. Bei einem Bestimmungsansatz mit 50×10^6 Zellen pro ml liegen die gemessenen Extinktionen im Bereich der linearen Abhängigkeit.

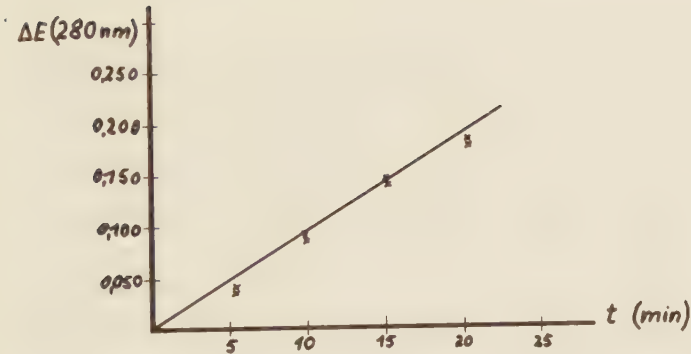


Abb. 4: Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von der Inkubationszeit; pH=7,6 , Temperatur 35°C , Substratkonzentration 1,0 g% Na-Caseinat

Diese Versuchsanordnung (Substratkonzentration = 1,0 g% Na-Caseinat, pH = 7,6 , Temperatur = 35°C , Zellkonzentration = 50×10^6 p. L. pro ml, Inkubationszeit = 15 min) ergibt bei der Bestimmung der proteolytischen Aktivität von p.L. unbehandelter Tiere im Mittel Extinktionswerte von $\Delta E = 0,1290$ bei einer Streuung von $s = 0,014371$ und einem Variationskoeffizienten von $v = 11,137936$. Der enzymatische Test zeigt unter diesen Bedingungen gute Reproduzierbarkeit. Die Berechnung von Mittelwert, Streuung, Variationskoeffizient, der linearen Regression und der Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte erfolgt nach den Wissenschaftlichen Tabellen, Documenta Geigy (52).

III.) Ergebnisse

Die Zahl der zu gewinnenden polymorphkernigen Leukocyten ist nach Behandlung mit den einzelnen Pharmaka sehr unterschiedlich. Nach 24-stündiger Behandlung mit Actinomycin D hat die Zahl der p.L. zugenommen (131,23 % des Normalwertes, $P < 0,001$). Bei einer Behandlung mit Actinomycin D über 48 Stunden ist die Zellzahl wieder im Normbereich, die Streuung ist allerdings sehr groß (s. Abb. 5). Die Behandlung mit Cycloheximid über 24 Stunden läßt die Zellzahl stark abfallen (57,86% des Normalwertes, $P < 0,001$). Nach Reverin- und Dexamethasonbehandlung liegen die Werte im Normbereich. Die anderen Pharmaka bewirken unterschiedliche Zellzahl im Peritonealexsudat (s. Abb. 5 und 6). Die Ursache hierfür ist unbekannt. Eine Beeinflussung des Ausschüttungsmechanismus ist nicht auszuschließen.

Aus der Differentialzellzählung der nach Giemsa gefärbten Ausstriche ergibt sich, daß auch die Zahl der einzelnen Leukocytenformen (p.L., Lymphocyten, Monocyten) Schwankungen unterliegt. Streptomycinbehandlung läßt die Zahl der p.L. auf 85,34% abfallen ($P < 0,001$). Nach Behandlung mit Cycloheximid über 24 Stunden steigt die Zahl der p.L. auf 93,12% an ($P < 0,001$). Die anderen Pharmaka zeigen keine eindeutige Wirkung auf die Zahl der zu gewinnenden Leukocytenformen (siehe Tabelle 1).

$\times 10^6$ Zellen pro Tier

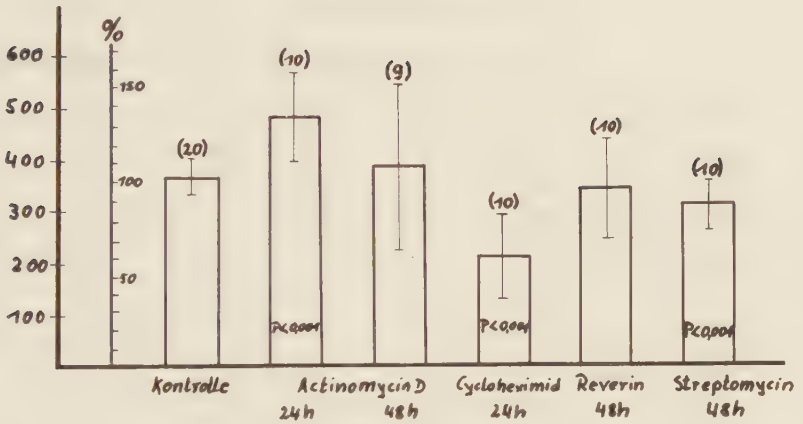


Abb. 5: Zahl der p.L. im Peritonealexsudat pro Tier; die Zahl über den Säulen gibt die Anzahl der untersuchten Tiere an; die Standardabweichung (2s) ist durch die eingezeichneten Strecken gekennzeichnet.

$\times 10^6$ Zellen pro Tier

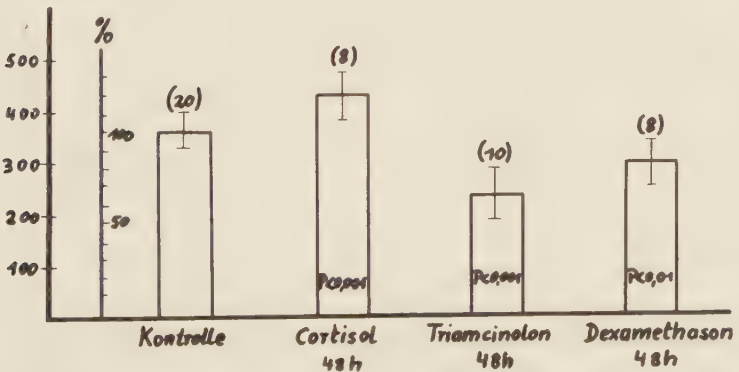


Abb. 6: Legende siehe Abb. 5

	500 ausgezählte Zellen			Angaben in %		
	p. L.	Lymphoc.	Monoc.	p. L.	Lymphoc.	Monoc.
Kontrolle	445,6	22,5	16,8	89,1	4,5	3,4
Actinomycin D _{24h}	460,6	24,1	10,4	92,1	4,3	2,1
Actinomycin D _{48h}	436,6	38,7	15,3	87,3	7,7	3,0
Cycloheximid	465,6	23,9	7,2	93,1	4,8	1,4
Reverin	436,8	40,5	17,0	87,4	8,1	3,4
Streptomycin	426,7	41,6	28,4	85,3	8,3	5,7
Cortisol	434,8	41,6	20,5	86,8	8,3	4,1
Triamcinolon	449,3	37,1	13,6	89,9	7,4	2,7
Dexamethason	464,1	23,1	9,5	92,8	4,6	1,9

Tabelle 1: Differentialzellzählung der nach Giemsa gefärbten Ausstriche, Auszählung von jeweils 500 Zellen (die an 500 bzw. 100% fehlenden Werte sind basophile- und eosinophile p.L. und Metamyelocyten).

Nach der Behandlung mit den einzelnen Pharmaka ist sowohl die Zellzahl als auch das Verhältnis der Leukocytenformen zueinander unterschiedlich.

Proteingehalt

Der Proteingehalt pro 50×10^6 p.L. ist nach Behandlung mit allen untersuchten Pharmaka gegenüber der Norm angestiegen. Die Behandlung mit Actinomycin D über 24 Stunden bzw. 48 Stunden läßt den Proteingehalt auf 143,5% bzw. 146,9% des Normalwertes ansteigen ($P < 0,001$). Nach der Behandlung mit Cycloheximid über 24 Stunden steigt er auf 143,2% des

Kontrollwertes an (s. Abb. 7 und 8).

Die Deutung dieses Phänomens folgt später.

mg Protein pro 50×10^6 Zellen

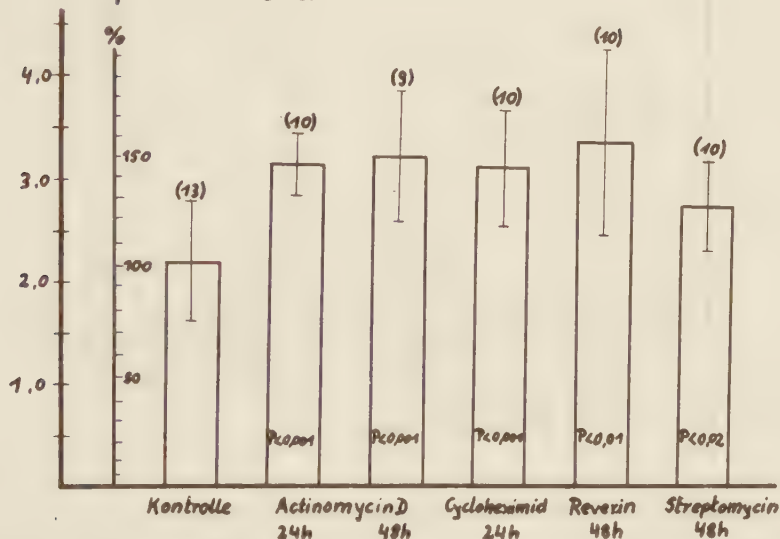


Abb. 7: Proteingehalt in mg pro 50×10^6 Zellen; die Standardabweichung (2s) ist durch die eingezeichneten Strecken angegeben; die Zahl der untersuchten Tiere ist in Klammern über den Säulen vermerkt; die Signifikanz der Differenz der Mittelwerte vom Kontrollwert ist in die einzelnen Säulen eingetragen.

mg Protein pro 50×10^6 Zellen

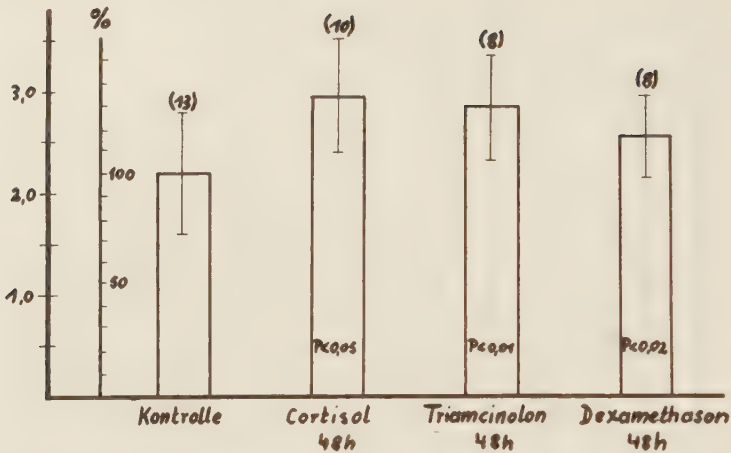


Abb. 8: Legende siehe Abb. 7

Die proteolytische Aktivität ($\Delta E/15\text{min}/50 \times 10^5$ Zellen) ist nach Behandlung mit Actinomycin D über 24 Stunden unverändert, nach 48 Stunden aber auf 56,7% des Kontrollwertes abgefallen. Die Behandlung mit Cycloheximid bewirkt einen Anstieg auf 134,8% des Normalwertes. Nach Behandlung mit Reverin, Streptomycin und den Steroiden zeigt sich keine deutliche Änderung der proteolytischen Aktivität (s. Abb. 9 und 10).

$\Delta E / 15 \text{ min} / 50 \times 10^6 \text{ Zellen}$

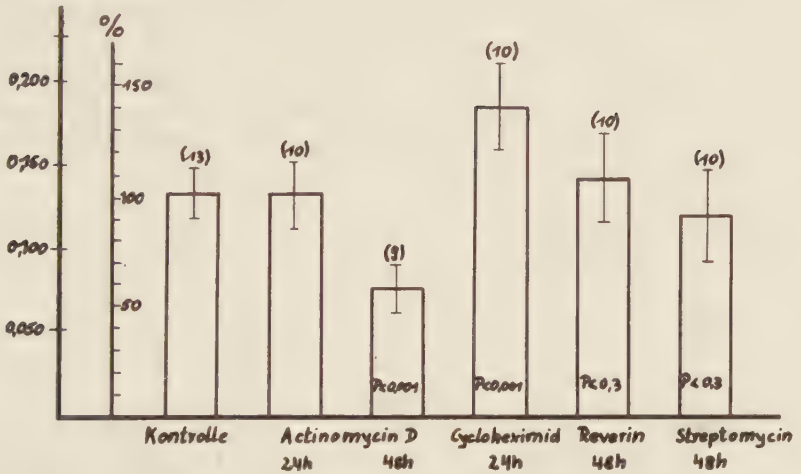


Abb. 9: Proteolytische Aktivität ($\Delta E / 15 \text{ min} / 50 \times 10^6 \text{ Zellen}$), übrige Angaben wie in Abb. 7.

$\Delta E / 15 \text{ min} / 50 \times 10^6 \text{ Zellen}$

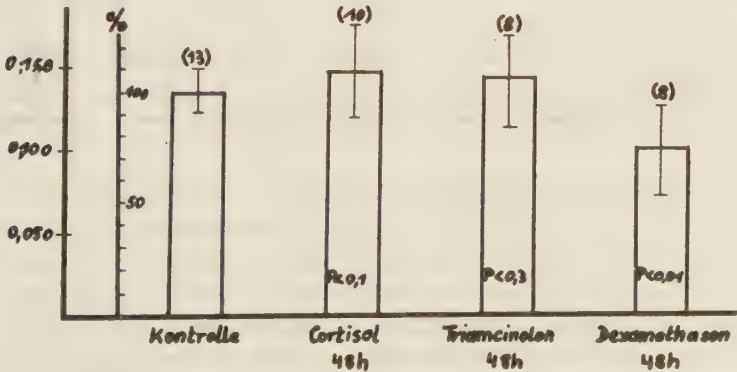


Abb. 10: Legende siehe Abb. 9

Die Effekte der einzelnen Pharmaka treten stärker in Erscheinung bei der Berechnung der spezifischen Aktivität ($\Delta E/15\text{min}/\text{mg Protein}$); sie ist teilweise erheblich vermindert. Nach 24 Stunden Behandlung mit Actinomycin D beträgt sie 63,9%, nach 48 Stunden nur noch 37,2% des Normalwertes. Steroidbehandlung verkleinert ebenfalls die spezifische Aktivität. Bei den kleinen Tierkollektiven ist der Unterschied allerdings nicht signifikant (s. Abb. 11 und 12).

$\Delta E/15\text{min}/\text{mg Protein}$

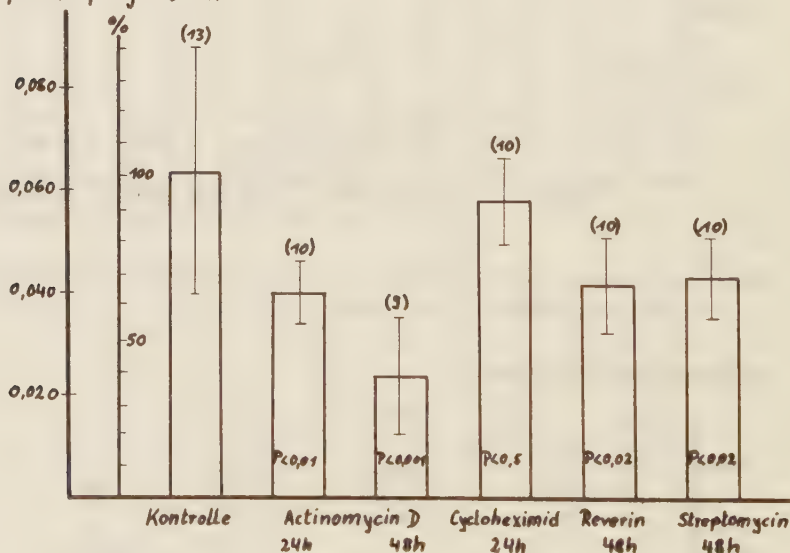


Abb. 11: Spezifische Aktivität ($\Delta E/15\text{min}/\text{mg Protein}$); die Standardabweichung (2s) ist durch die eingezeichneten Strecken angegeben; die Zahl der untersuchten Tiere ist in Klammern über den Säulen vermerkt; die Signifikanz der Differenz der Mittelwerte vom Kontrollwert ist in die einzelnen Säulen eingetragen.

$\Delta E / 15 \text{ min} / \text{mg Protein}$

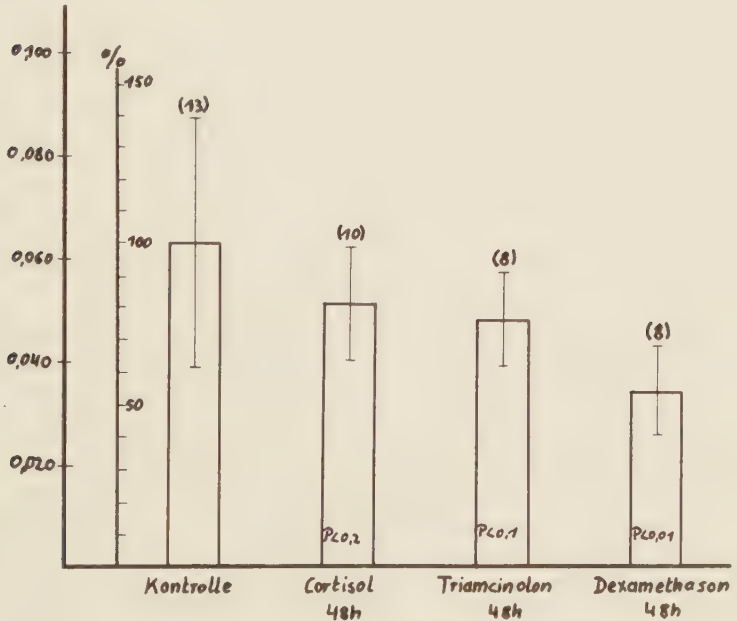


Abb. 12: Spezifische Aktivität ($\Delta E / 15 \text{ min} / \text{mg Protein}$); die Standardabweichung (2s) ist durch die eingezeichneten Strecken angegeben; die Zahl der untersuchten Tiere ist in Klammern über den Säulen vermerkt; die Signifikanz der Differenz der Mittelwerte vom Kontrollwert ist in die einzelnen Säulen eingetragen.

Nach diesen Untersuchungen weisen die p.L. von Tieren, die mit Actinomycin D oder Dexamethason behandelt wurden, mehr Protein und weniger proteolytische Aktivität auf. Bei allen anderen getesteten Pharmaka ist eine ähnliche Wirkung auf die p.L. anzunehmen.

IV.) Diskussion

Bisher ist über die proteolytische Aktivität der p.L. wenig bekannt, während andere hydrolytische Enzyme der p.L., saure und alkalische Phosphatasen, Cathepsine und einige Peptidasen eingehender untersucht worden sind (17, 22, 27, 35-37, 41, 42, 45-47).

Die proteolytische Aktivität der Leukocyten ist von Husfeld (33), Panlitschko und Stattnann (44) sowie von Mounter und Atiyeh (43) analysiert worden. Sie verwendeten menschliche Leukocyten, die sie durch Sedimentation aus dem Gesamtblut gewonnen haben. Als Substrat diente neben Casein bei Husfeld Edestin und bei Mounter und Atiyeh auch Haemoglobin.

Mounter und Atiyeh (43) und Panlitschko und Stattnann (44) finden in menschlichen Leukocyten proteolytische Aktivität im alkalischen Bereich. Bei der Hemmung der Protease durch Di-n-butyl-Fluorophosphat zeigt sich in der pH-Abhängigkeit eine größere Ähnlichkeit mit Chymotrypsin als mit Trypsin. 1% Sapocin inhibiert die alkalische Protease (pH=8), aber nicht Trypsin und Chymotrypsin. Nach Panlitschko und Stattnann wird Ovalbumin zwar von der alkalischen Protease angegriffen, nicht aber von Trypsin und Chymotrypsin; ferner zeigt die alkalische Protease eine geringere Hemmung durch Serum als kristallisiertes Trypsin.

Diese Untersuchungen legen nahe, eher von einer trypsin- und chymotrypsinähnlichen Wirkung zu sprechen, als eine direkte Wirkung dieser beiden Enzyme in den p.L. anzunehmen.

Die Glycylglycin-Dipeptidase besitzt in den Lymphocyten bedeutend größere Aktivität als in den p.L. (45). Die durch Reizung des Peritoneums mit Glycogen gewonnenen Leukocyten weisen eine andere Stoffwechselcharakteristik auf als p.L., die durch Injektion von Na-Caseinat in die Bauchhöhle gewonnen werden (24).

Weil schon die unterschiedliche Gewinnung von Granulocyten die Proteasenaktivität beeinflusst, ist die Interpretation der Ergebnisse verschiedener Untersucher äußerst schwierig.

Der Einfluß verschiedener Pharmaka (Actinomycin D, Cycloheximid, Reverin, Streptomycin, Cortisol, Triamcinolon, Dexamethason) auf die proteolytische Aktivität der p.L. ist bisher nicht untersucht. Die eigenen Untersuchungen werden mit p.L. aus dem Peritonealexsudat von Ratten durchgeführt. Die p.L. werden 24 Std. nach i.p. Applikation von Na-Caseinat aus der Bauchhöhle gewonnen (21,24). Die Methode der Zellgewinnung nach Karnovsky und Mitarb. (21, 24) ist gewählt, weil sie im Gegensatz zu anderen Methoden (24, 45, 47) ohne großen zeitlichen- und Materialaufwand ein an p.L. reiches Exsudat ergibt. Zum anderen werden Exsudatleukocyten verwendet, weil insbesondere bei der akuten Entzündung mit vasculär haemato-ger Reaktion die genannten Pharmaka teilweise angewendet werden. Es ist daher zu fragen, ob diese die Dynamik der Entzündung wesentlich bestimmenden cellulären Elemente durch die Therapie in ihrer charakteristischen Eigenschaft verändert werden können.

Wie bereits oben ausgeführt, weisen die bisherigen Untersuchungen darauf hin, daß sich die proteolytische Aktivität im alkalischen Bereich wohl aus dem Zusammenwirken mehrerer Enzyme ergibt. Unsere Untersuchungen decken sich hinsichtlich des pH-Optimums mit denen anderer Untersucher (33, 43, 44, 51).

Die Zahl der Leukocyten ist nach Behandlung mit den einzelnen Pharmaka unterschiedlich groß (s. Abb. 4 und 5); auch die prozentuale Zusammensetzung der Zelltypen im Exsudat unterliegt gewissen Änderungen durch die Pharmaka (s. Tabelle 1).

Die 24-stündige Behandlung mit Actinomycin D läßt die Zellzahl auf 131% ansteigen; sie ist aber nach 48 Std. auf den Normalwert zurückgefallen (s. Abb. 5) . Nach der bekannten Wirkung von Actinomycin D Hemmung der RNS-Polymerase schei-nen celluläre Prozesse, die eine direkte Teilnahme von DNS-

Molekülen erfordern, sehr empfindlich für Actinomycin D zu sein (53, 54, 55, 62, 63, 64, 79, 80). Aus dieser Wirkung von Actinomycin D - vor allem bei Versuchen längerer Dauer - können jedoch Schlüsse nur mit Vorsicht gezogen werden (56, 81, 82, 83). Ein Einfluß auf die Entwicklung der p.L. im Knochenmark (Proliferation) könnte sich nach 24 Std. bzw. 48 Std. noch nicht meßbar auswirken, da die Gesamtdurchgangszeit vom Myeloblasten zum p.L. etwa 133 - 159 Std. beträgt (85). Somit verbleibt ein Einfluß auf die Zellreifung und Speicherung ausgereifter p.L. . Ob nach 24 Std. eine Wirkung des Actinomycin D auf den Ausschüttungsmechanismus oder auch andere Wirkungen in Frage kommen, läßt sich nicht mit Bestimmtheit sagen. Der Rückgang der Zellzahl nach 48 Std. mit der auffälligen Streubreite könnte auf eine Wirkung des Actinomycin D auf die Ausreifung der p.L. im Reifungsspeicher hinweisen.

Nach Behandlung mit Cycloheximid über 24 Std. fällt die Zellzahl auf 57,8% des Kontrollwertes (s. Abb. 5). Durch Cycloheximide wird der Einbau von Aminosäuren aus Aminoacyl-t-RNS in Peptide blockiert (61, 65, 66, 86). Die Senkung der Zellzahl beruht eher auf der toxischen Wirkung dieses Pharmakons als auf der Hemmung der Proteinsynthese, da letztere nach 24 Std. noch keinen sicheren Einfluß auf die Zahl der p.L. haben kann.

Streptomycin führt nach einer Behandlung über 48 Std. zu einem Abfall der Zellzahl auf 85,9% (s. Abb. 5). Eine hemmende Wirkung des Streptomycins auf die Proteinsynthese tritt nur dann ein, wenn das Antibiotikum vor der m-RNS an das Ribosom gebunden wird, wo es am 30 S-Anteil des Ribosoms angreift (57, 58, 67, 84). Unter der Wirkung von Streptomycin kommt es zum falschen Ableseprozess des Codes.

Die Behandlung mit Cortisol läßt die Zahl der p.L. im Peritonealexsudat ansteigen. Dagegen führt eine Behandlung mit Triamcinolon und Dexamethason zu einem Abfall der p.L. im Peritonealexsudat (s. Abb. 6). Einen Anstieg von p.L. im Gesamtblut nach Behandlung mit Corticosteroiden finden auch Kowalsky und Mitarb. (59) und Nelson und Mitarb. (60) bei ihren Untersuchungen.

Wie bei der Behandlung mit Actinomycin D kann auch nach Streptomycin und den Glucocorticoiden eine Beeinflussung der Zellreifung und Speicherung ausgereifter p.L. in Betracht gezogen werden. Eine Eindeutige Erklärung ist auch hier nicht möglich.

Nach Behandlung mit allen Pharmaka steigt der Proteingehalt pro 50×10^6 Zellen an (s. Abb. 7 und 8). Diese Erhöhung des Proteingehaltes pro Zelle kann hervorgerufen sein durch eine Vermehrung der zelleigenen Proteine oder durch phagocytiertes Protein. Außerdem könnte Protein durch Opsoninwirkung der Pharmaka an die Zelloberfläche angelagert worden sein.

Nach der Behandlung mit den Antibiotika ist eine Hemmung der Synthese von Enzymproteinen warscheinlicher und somit eine Verminderung der zelleigenen Proteine anzunehmen, wenggleich Streptomycin auch zu einer Steigerung der Synthese von falschem Protein führen kann (84). Ebenso könnte die Erhöhung des Proteingehaltes pro Zelle auf einer Hemmung der Proteolyse von phagocytiertem Eiweiß beruhen. Der verminderte Abbau und die verstärkte Speicherung von phagocytiertem Protein würden in diesem Falle die zu vermutende Hemmung der zelleigenen Proteinsynthese durch die Pharmaka überdecken.

Die Erhöhung des Proteingehaltes von p.L. nach Behandlung mit Glucocorticoiden ist sicher nicht nur auf einen Mechanismus zurückzuführen. So unterdrücken die Glucocorticoide die Fähigkeit der p.L. zu Phagocytose bei unspezifischen Entzündungen (68, 69, 70, 71, 72-78). Zum anderen vermindern Glucocorticoide in der Muskulatur die Proteinkonzentration, was unter anderem durch eine vermehrte Bildung bestimmter Enzyme bedingt sein könnte (87).

Die proteolytische Aktivität der p.L. zeigt nach 24 Std. Behandlung mit Actinomycin D Normalwerte; dagegen ist sie nach 48 Std. auf 55% des Kontrollwertes gesunken (s. Abb. 9). Gleiche Verhältnisse zeigt die spezifische Aktivität mit einem Abfall auf 35% des Kontrollwertes nach 48 Std. (s. Abb. 11). Die Senkung der proteolytischen Aktivität ist

sicher eine Folge der Wirkung von Actinomycin D auf die Proteinsynthese. Nach Boll (5) ist der Wirkungseintritt des Actinomycin D nach 48 Std. verständlich, wenn man nach ihren Untersuchungen eine Generationszeit von 30 Std. annimmt.

Die Behandlung mit Cycloheximid über 24 Std. führt zu einem Anstieg der proteolytischen Aktivität auf 134% des Normalwertes (s. Abb. 9); die spezifische Aktivität ist fast unverändert (s. Abb. 11). Der Anstieg der proteolytischen Aktivität nach Behandlung mit Cycloheximid ist nach den bisherigen Untersuchungen über Cycloheximid etwas überraschend (61, 65, 66, 86). Eine Hemmung der Synthese von Enzymprotein muß sich nach 24 Std. jedoch noch nicht meßbar auswirken (5). Ennis und Lubin (66) weisen nach, daß nach einer Inkubation mit Cycloheximid die Proteinsynthese wieder in Gang kommt, wenn die Zellen vom Pharmakon freigewaschen werden. Inwieweit dieser Effekt bei in vivo Versuchen über 24 Std. mit einer einmaligen Injektion sich auswirken kann, ist nicht zu beantworten. Somit läßt sich eine eindeutige Erklärung dieses Phänomens nicht geben.

Nach Behandlung mit Reverin und Streptomycin ist kein eindeutiger Einfluß auf die proteolytische Aktivität der p.L. und auf die spezifische Aktivität festzustellen (s. Abb. 9 und 11). Nach Behandlung mit den Glucocorticoiden (Cortisol, Triamcinolon, Dexamethason) zeigt sich ein annähernd gleiches Bild (s. Abb. 10 und 12). Die Abnahme der proteolytischen Aktivität nach Behandlung mit Dexamethason könnte durch Enzym-Repression erklärt werden (74 - 78), wobei die Glucocorticoide als Co-Repressoren wirken.

Eine direkte Wirkung der Pharmaka auf die proteolytische Aktivität der p.L. konnte durch in vitro Versuche ausgeschlossen werden. Die Inkubation der Pharmaka mit dem Homogenat unbehandelter p.L. blieb ohne Effekt auf die proteolytische Aktivität.

V.) Zusammenfassung

- 1.) Es wird die proteolytische Aktivität polymorphkerniger Leukocyten (p.L.) nach Behandlung mit Actinomycin D, Cycloheximid, Reverin, Streptomycin, Cortisol, Triamcinolon und Dexamethason untersucht. Die p.L. werden aus der Bauchhöhle von Sprague-Dawley Ratten gewonnen und die TCE-löslichen Aminosäuren nach Spaltung von Na-Caseinat enzymatisch bestimmt.
- 2.) Der Anstieg der Zellzahl nach Behandlung mit Actinomycin D über 24 Std. und Cortisol über 48 Std. könnte auf einer Beeinflussung des Knochenmarkes (Zellreifung und Speicherung ausgereifter p.L.) beruhen.
Der Abfall der Zellzahl nach Behandlung mit Actinomycin D über 48 Std. auf den Kontrollwert scheint auf eine Wirkung dieses Pharmakons auf die Zellreifung hinzuweisen.
Der Rückgang der Zellzahl nach Behandlung mit Cycloheximid beruht dagegen eher auf einer toxischen Wirkung dieses Pharmakons.
Der Abfall der Zellzahl nach Behandlung mit den anderen Pharmaka läßt wie bei der Behandlung mit Actinomycin D über 24 Std. eher eine Beeinflussung des Knochenmarkes (Zellreifung und Speicherung ausgereifter p.L.) in betracht ziehen.
- 3.) Die Erhöhung des Proteingehaltes der p.L. nach Behandlung mit allen Pharmaka beruht wahrscheinlich auf einer Hemmung der Proteolyse von phagocytiertem Protein.
- 4.) Die proteolytische Aktivität der p.L. ist nach Behandlung mit Actinomycin D über 24 Std. unverändert, nach 48 Std. aber auf 55% des Normalwertes abgefallen. Die Abnahme der proteolytischen Aktivität ist sicher auf eine Hemmung der Synthese von Enzymprotein durch Actinomycin D zurückzuführen.
Der Anstieg der proteolytischen Aktivität nach Behandlung mit Cycloheximid nach 24 Std. ist nicht eindeutig zu erklären.

Die Behandlung mit Reverin, Streptomycin, Cortisol, Triamcinolon und Dexamethason über 48 Std. zeigt keine eindeutige Beeinflussung der proteolytischen Aktivität.

- 5.) Ein direkter Einfluß der Pharmaka auf die proteolytische Aktivität der p.L. konnte durch in vitro Versuche ausgeschlossen werden.
- 6.) Die spezifische Aktivität ist zum Teil erheblich vermindert. Sie beträgt nach 48 Std. Behandlung mit Actinomycin D nur noch 37,2% des Kontrollwertes. Nach Behandlung mit den anderen Pharmaka ist sie aber zum großen Teil nicht so deutlich vermindert.

VI.) LITERATURVERZEICHNIS

- 1) NEUMANN, E. : Über die Bedeutung des Knochenmarkes für die Blutbildung.
Zbl. med. Wiss. 6, 689 (1868)
- 2) EHRLICH, P. : Beiträge zu Kenntnis der Anilinfärbung und ihre Verwendung in der mikroskopischen Technik.
Arch. mikr. Anat. 13, 263 (1877)

EHRLICH, P. : Methodische Beiträge zu Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten.
Z. klin. Med. 1, 553 (1880)
- 3) METSCHNIKOFF, E. : Arb. zoolog. Inst. Univ. Wien zool. Stat. Triest 5, H. 2 (1883)
zit. nach: Becker, Hj., Munder, G., Fischer, E.:
Über den Leukocytenstoffwechsel bei der Phagocytose.
Hoppe-Seyler's Zeitschr.
physiol. Chemie 313, 266 (1958)
- 4) WOLFF, A. : Über eine Methode zur Untersuchung des lebenden Knochenmarkes von Tieren und über das Bewegungsvermögen der Myelocyten.
Dtsch. med. Wschr. 10, 165 (1903)
- 5) BOLL, I. : Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
in: Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik; Bd. 17 (R. Hegglin, F. Leuthardt, R. Schoen, H. Schwiegk, A. Studer, H. U. Zollinger, Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1966
- 6) HAGUENAU, F. : The ergastoplasma: its history, ultra-structure and biochemistry.
Int. Rev. Cytol. 7, 425 (1958)

- 7) BAINTON, D. F. and FARQUHAR, M. G. : Origin and nature of polymorphnuclear leukocyte granules.
J. Cell Biol. 27, 6A (1965)
- 8) BAINTON, D. F. and FARQUHAR, M. G. : Origin of granules in polymorphnuclear leukocytes.
J. Cell Biol. 28, 277 (1966)
- 9) BAGGIOLINI, M., HIRSCH, J. G., de DUVE, C. : Résolution of granules from rabbit heterophil leukocytes into distinkt populations by zonal sedimentation.
J. Cell Biol. 40, 529 (1969)
- 10) ACKERMANN, S. A. : Histochemical differentiation during neutrophil development and maturation.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 113, 537 (1964)
- 11) BAINTON, D. F. and FARQUHAR, M. G. : Enzym composition of polymorphnuclear leukocyte granules.
J. Cell Biol. 31, 8A (1966)
- 12) LUTZNER, M. A. : Enzym specialization of organelles of blood cells, mast cells and platelets.
Fed. Proc. 23, 441 (1964)
- 13) GOMORI, G. : Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 42, 23 (1939)
- 14) RHEINGOLD, J. J., WISLOCKI, G. B. : Histochemical methods applied to hematology.
Blood 3, 641 (1948)
- 15) WISLOCKI, G. B., RHEINGOLD, J. J., DEMPSEY, E. W. : The occurrence of the periodic acid Schiff reaktion in various normal cells of blood and connective tissue.
Blood 4, 562 (1949)

- 16) BLOOM, M. L., WISLOCKI, G. B. : The localisation of lipids in human blood and bone marrow cells.
Blood 2, 79 (1950)
- 17) SIROLA, I., SIROLA, K. : A histochemical study of alkaline phosphatase in the leukocytes of blood and bone marrow in various diseases.
Acta haemat. 18, 313 (1957)
- 18) PLENNERT, W. : Zytochemie der Leukocyten.
Folia Haematologica 81, 1 (1964)
- 19) IYER, G. Y. N., ISLAM, D. M. F., QUASTEL, F. R. S. : Biochemical aspects of phagocytosis.
Nature 192, 535 (1961)
- 20) COHN, Z. A., MORSE, S. J. : Interactions between rabbit polymorphnuclear leukocytes and staphylococci.
J. Exp. Med. 110, 419 (1959)
- 21) SBARRA, A. J., KARNOVSKY, M. L. : The biochemical basis of phagocytosis: I.) Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphnuclear leukocytes.
J. Biolog. Chem. 234, 1355 (1959)
- 22) BECKER, H., MUNDER, G., FISCHER, H. : Über den Leukocytenstoffwechsel bei der Phagocytose.
Z. physiol. Chem. 313, 266 (1958)
- 23) VAUGHAN, R. B. : The comparative in vitro phagocytic activity of rabbit polymorphnuclear leukocytes and macrophages.
Brit. J. Exp. Path. 46, 82 (1965)
- 24) STÄHELIN, H., SUTER, E., KARNOVSKY, M. L. : Studies on the interaction between phagocytosis and tubercle bacilli. I.) Observations on the metabolism of guinea pig

leukocytes and the influence of phagocytosis.

J. Exp. Med. 104, 121 (1956)

- 25) SBARRA, A. J., KARNOVSKY, M. L. : The biochemical basis of phagocytosis. II.) Incorporation of C^{14} - labeled building blocks into lipid, protein and glycogen of leukocytes during phagocytosis.
J. Biolog. Chem. 235, 2224 (1960)
- 26) KARNOVSKY, M. L., HOELZL WALLACH, D. F.: The metabolic basis of phagocytosis. III.) Incorporation of inorganic phosphat into various classes of phosphatides during phagocytosis.
J. Biolog. Chem. 236, 1895 (1961)
- 27) CRAM, D. M., ROSSITER, R. J. : Phosphatase of rabbit polymorphnuclear leukocytes.
Canad. J. Research, section E 27, 290 (1949)
- 28) ROSSITER, R. J., WONG, E. : β -glucuronidase of rabbit polymorphnuclear leukocytes.
Canad. Research 28, 69 (1946)
- 29) BAGGIOLINI, M., HIRSCH, J. G., de DUVE, C. : Resolution of granules from rabbit heterophil leukocytes into distinct populations by zonal sedimentation.
J. Cell Biol. 40, 529 (1969)
- 30) ROSSITER, R. J., WONG, S.: Esterase of rabbit polymorphnuclear leukocytes.
J. Biol. Chem. 180, 973 (1949)
- 31) OPIE, E. L. : Intracellular digestion. The encyme and antiencymes concerned.
Physiol. Revue 2, 552 (1922)
- 32) WILLSTATTER, R., BAMANN, E., ROHDEWALD, M. : Zur Kenntnis

der proteolytischen Aktivität farbloser Blutkörperchen.

Hoppe-Seyler's Zeitschr. physiol. Chem.
185, 267 (1929)

- 33) HUSFELD, E. : Proteolytische Enzyme in den Leukocyten des Menschen.

Hoppe-Seyler's Zeitschr. physiol. Chem.
194, 137 (1931)

- 34) BARNES, J. M. : The encymes of lymphocytes and polymorphnuclear leukocytes.

Brit. J. Exp. Path. 21, 264 (1940)

- 35) NACHLAS, M. M., CRAWFORD, D. T., SELIGMAN, A. M.: The histochemical demonstration of leucin-aminopeptidase. J. Histochem. and Cytochem. 5, 264 (1957)

- 36) COHN, Z. A., HIRSCH, J. G. : The isolation and properties of the specific cytoplasmatic granules of rabbit polymorphnuclear leukocytes.

J. Exp. Med. 112, 983 (1960)

- 37) ACKERMANN, G. A. : Histochemical demonstration of amino-peptidase activity in the cells of the blood and bone marrow from various hematological disorders. Nature 197, 189 (1963)

- 38) MERKER, H. J. : Struktur und Funktion der Lysosomen. Materia Media Nordmark XVII/15,1 S. 684 (1965)

- 39) MERKER, H. J. : Cytochemie der Blutzellen.

in: Handbuch der Inneren Medizin, Bd. II, 1. Teil,
(H. Schwiegk, L. Heilmeyer, Hrsg.)
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968)

- 40) LAPRESLE, C., WEBB, T. : Study of a proteolytic encyme from rabbit spleen.

Biochem. J. 26, 538 (1960)

- 41) LAPRESLE, C., WEBB, T. : The purification and properties of a proteolytic enzyme, rabbit cathepsin E and further studies on rabbit cathepsin D.
- 42) STEFANOVIC, J., WEBB, T., LAPRESLE, C. : unveröffentlichte Arbeit; zit. nach C. Lapresle und T. Webb, in: Biochem. J. 84, 455 (1962)
- 43) MOUNTER, L. A., ATIYEH, W. : Proteases of human leukocytes. Blood 15, 52 (1960)
- 44) PANLITSCHKO, M., STATTMANN, K. : Die proteolytischen Enzyme der weißen Blutkörperchen. Biochem. Zeitschr. 326, 252 (1955)
- 45) FLEISCHER, G. A. : Peptidases in human leukocytes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 59, 1012 (1955)
- 46) STERN, K., BIRMINGHAM, M. K., CULLEN, A., RICHTER, B. : Peptidase activity in leukocytes, erythrocytes and plasma of young and senile subjects. J. Clin. Invest. 30, 84 (1951)
- 47) FREI, J., HORVATH, G., CULLITY, B., VANOTTI, A. : Encymatic studies in the different types of normal and leukemic human white cells. Blood 18, 317 (1961)
- 48) SCHMIDT, G. : Phosphoproteide in: Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse; (K. Lang, E. Lehnartz, Hrsg.) 10. Auflage, Bd. IV, 1 S. 618, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1960)

- 49) KUNITZ, M. : Crystallin soybean trypsin inhibitor;
II.) General properties.
J. Gen. Physiol. 30, 291 (1947)
- 50) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL,
R. J.: Protein measurement with the folin-phenol
reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- 51) KLEINMANN, H., SCHARR, G. : Untersuchungen über tierische
Gewebsproteasen; VIII.) Über proteolytische Fermente
in den weißen Blutkörperchen verschiedener Tierarten.
Biochem. Zeitschr. 251, 275 (1932)
- 52) DOCUMENTA GEIGY : Wissenschaftliche Tabellen
J. R. Geigy A.G. Basel, 5. Auflage (1965)
- 53) REICH, E., CERAMI, A., WARD, D. C. : Actinomycin
in: Antibiotics (D. Gottlieb, P. D. Shaw, Hrsg.)
Bd. I, Mechanism of action; Springer-Verlag,
Berlin-Heidelberg-New York 1967
- 54) HARTMANN, G., COY, U., KNEISE, G., : Zum biologischen
Wirkungsmechanismus der Actinomycine.
Hoppe-Seyler's Zeitschr. physiol. Chemie
330, 227 (1962)
- 55) KERSTEN, W., KERSTEN, H., : Zur Wirkungsweise von Actino-
mycinen; III. Bindung von Actinomycin C an Nuclein-
säuren und Nucleotide.
Hoppe-Seyler's Zeitschr. physiol. Chemie
330, 21 (1962)
- 56) OBERDISSE, E. : Einfluß von Pharmaka auf die Aktivität
normaler und induzierter Fermente der Rattenleber.
Habilitationsschrift Med. Fak. Freie Universität
Berlin (1970)

- 57) PLEMPPEL, M.; Wirkungsmechanismen antibakteriell und antimykotisch wirksamer Chemotherapeutika. Internist 8, 192 (1967)
- 58) JACOBI, G. A., GORINI, L. : The effect of streptomycin and other aminoglycoside antibiotics on protein synthesis. in: Antibiotics (D. Gottlieb, P. D. Shaw eds.) Bd. I, Mechanism of action; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967)
- 59) KOWALSKY, H. J., REYNOLDS, W. E., RUTSTEIN, D. D., : Changes in white blood cell counts after administration of cortisonacetat to healthy ambulatory individuals. J. Lab. and Clin. Med. 40, 841 (1952)
- 60) NELSON, D. H., SANDBERG, A. A., PALMER, J. G., TYLER, F. H. : Blood levels of 17-hydroxycorticosteroids following the administration of adrenal steroids and their relation to the level of circulating leucocytes. J. Clin. Invest. 31, 843 (1952)
- 61) SISLER, H. D., SIEGEL, M. R., : Cycloheximide and other glutarimide antibiotics. in: Antibiotics (D. Gottlieb, P. D. Shaw, Hrsg.) Bd. I, Mechanism of action; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967)
- 62) MOOG, F., : Acceleration of the normal and corticoid induced increase of alkaline phosphatase in the duodenum of the nursing mouse by actinomycin D, puromycin, colchicin and ethionine. Advanc. Enzyme Regulat. 3, 221 (1965)
- 63) GARREN, L. D., HOWELL, R. R., TOMKINS, G. M., CROCCO, R. M., : A paradoxical effect of actinomycin D : The mechanism of regulation of enzyme synthesis by

hydrocortisone.

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 52, 1121 (1964)

- 64) DINGMANN, C. W., SPORN, M.B., : Actinomycin D and hydrocortison: Intracellular binding in rat liver. Sciences 149, 1251 (1965)
- 65) COLOMBO, B., FELICETTI, L., BAGLIONI, C., : Inhibition of protein synthesis by cycloheximide in rabbit reticulocytes. Biochem. and Biophys. Res. Comm. 18, 389 (1965)
- 66) ENNIS, H., LUBIN, M., : Cycloheximide: Aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells. Sciences 146, 1474 (1964)
- 67) MOSKOWITZ, M., KELKER, N., : Amino-acid control of streptomycin action on mammalian cells. Nature 205, 476 (1965)
- 68) WHITE, A., BLECHER, M., JEDEIKIN, L. A., : Mechanism of action of adrenal cortical hormones; in: Mechanism of action of steroid hormones, (C.A.Ville, L. L. Engel, eds.) Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris (1961)
- 69) MICHAEL Jr., M., WHORTON, C. M., : Delay of the early inflammatory response by cortisone. Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 76, 754 (1951)
- 70) GLASER, R. J., BERRY, J. W., LOEB, L. H., WOOD Jr. W. B., : The effect of cortisone in streptococcal lymphadenitis and pneumonia. J. Lab. and Clin. Med. 38, 363 (1951)
- 71) DOUGHERTY, T. F., SCHNEEBELLI, G. L., : The use of steroids as anti-inflammatory agents. Ann. N. Y. Acad. Sci. 61, 328 (1955)

- 72) KETCHEL, M. M., FAVOUR, C. B., STURGES, S. H., : The in vitro action of hydrocortisone on leucocyte migration.
J. exp. Med. 107, 211 (1958)
- 73) CREPEA, S. B., MAGNIN, G. E., SEASTONE, C. V., :Effect of ACTH and cortisone on phagocytosis.
Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 77, 704 (1951)
- 74) HÜBENER, H. J., : Die physiologische Funktion der Nebennierenrinden-Hormone als Enzym-Induktoren.
Deutsche Med. Wochenschr. 87, 438 (1962)
- 75) NOALL, M. W., RIGGS, T. R., WALKER, L. M., CHRISTENSEN, H. N., : Science 126, 1002 (1957); zit. nach Hübener, H.J., in: Deutsche Med. Wochenschr. 87, 438 (1962)
- 76) RUSSEL, J. A., : Endokrinology 49, 99 (1951); zit. nach: Hübener, H.J., in: Deutsche Med. Wochenschrift 87, 438 (1962)
- 77) HILZ, H., : persönliche Mitteilung; zit. nach Hübener, H.J., in: Deutsche Med. Wochenschr. 87, 438 (1962)
- 78) EBERT, R. H., WISSLER, R. W., : In vitro observations of the effects of cortisone on the vascular reaction to large dosis of horse serum using the rabbit ear chamber technique.
J. Lab. and Clin. Med. 38, 497 (1951)
- 79) REICH, E., FRANKLIN, R. M., SHATKIN, A. J., TATUM, E. L., : Effect of actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production.
Science 134, 556 (1961)
- 80) REICH, E., FRANKLIN, R. M., SHATKIN, A. J., TATUM, E. L., : Action of actinomycin D on animal cells and viruses.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 48, 1238 (1962)

- 81) HONIG, G. R., RABINOVITZ, M., : Actinomycin D: inhibition of protein synthesis unrelated to effect on template RNA synthesis.
Science 149, 1504 (1965)
- 82) HELGELAND, K., REISTAD, R., : Effect of actinomycin D in tissue culture cells: an altered DNA distribution after extraction with phenol or chloroform-butanol.
Biochem. biophys. Acta (Amst.) 145, 214 (1967)
- 83) SOEIRO, R., AMOS, H., : m-RNA half-life measured by use of actinomycin D in animal cells - a caution.
Biochem. biophys. Acta (Amst.) 129, 406 (1966)
- 84) NEUBERT, D., : Beeinflussung des Nucleinsäure- und Protein-stoffwechsels durch Pharmaka.
Internist, 7, 435 (1966)
- 85) FLIEDNER, T. M., CALVO, W., : Orthologie und Pathologie der Knochenmarkregeneration. in: Hdb. der Allgemeinen Pathologie (H. W. Altmann, F. Büchner, H. Cottier, E. Grundmann, G. Holle, E. Letterer, W. Maßhoff, H. Meesen, F. Roulet, G. Seifert, G. Siebert, A. Studer, Hrsg.) Bd. VI, 2 S. 375
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969)
- 86) STANNERS, C. P., : The effect of cycloheximide on polyribosomes from hamster cells.
Biochem. biophys. Res. Comm. 24, 758 (1966)
- 87) KEWITZ, H., : Variation der Einflüsse auf die Enzymausstattung der Zelle durch Pharmaka..
Internist, 7, 391 (1966)

An dieser Stelle möchte ich mich
vor allem bei Herrn Professor
Dr. med. U.M. Gross für die An-
regung der Arbeit und für die
wohlwollende Hilfe bei allen
aufgetretenen Problemen bedanken.

Herrn Professor Dr. med. W. Mass-
hoff danke ich für die freundli-
che Überlassung des Arbeitsmate-
riales und des Laborplatzes.

VII.) Lebenslauf

Am 3. 9. 1939 wurde ich, Theodor Balsing, in Harsewinkel in Westfalen als Sohn des Arbeiters Theodor Balsing und seiner Ehefrau Elisabeth geborene Ellebracht als viertes von fünf Kindern geboren. Mein Vater starb 1942. Von 1946 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Harsewinkel. Am 1. April 1954 begann ich meine Lehre als Maschinenschlosser. Nach 3,5 - jähriger Lehrzeit bestand ich im Herbst 1957 die Facharbeiterprüfung als Maschinenschlosser. 1958 ging ich zum Gymnasium Clementinum nach Bad Driburg. Dort bestand ich im Frühjahr 1964 die humanistische Reifeprüfung.

Nach zwei Semestern Theologiestudium an der Universität Münster in Westfalen begann ich 1965 mit dem Medizinstudium an der Freien Universität Berlin, wo ich auch das Vorphysikum und das Physikum bestand. Die klinischen Semester studierte ich ebenfalls in Berlin. Am 2. 8. 1971 bestand ich hier das Medizinische Staatsexamen.

